

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Gebrauchsmuster**
⑩ **DE 298 00 547 U 1**

⑳ Aktenzeichen: 298 00 547.6
㉑ Anmeldetag: 16. 1. 98
㉒ Eintragungstag: 8. 4. 99
㉓ Bekanntmachung
im Patentblatt: 20. 5. 99

㉔ Int. Cl.⁶:
C 12 N 9/88
C 12 N 15/63
C 12 Q 1/527
// (C12N 9/88, C12R
1:19)A01N
57/20,A61K
31/66

DE 298 00 547 U 1

⑮ Innere Priorität:
197 52 700. 0 28. 11. 97

⑮ Inhaber:
Hoechst Schering AgrEvo GmbH, 13509 Berlin, DE;
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

Rechercheantrag gem. § 7 Abs. 1 GbmG ist gestellt

⑮ 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat Synthase und Effektoren der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

DE 298 00 547 U 1

20.01.98

Hoechst Schering AgrEvo GmbH

AGR 97/M 225 UM

Dr.Rl/pp

1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase und Effektoren der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase (DXS) sowie Effektoren der DXS.

10

Isoprenoide stellen eine sehr umfangreiche Klasse von Naturstoffen dar und umfassen eine Vielzahl essentieller Verbindungen wie beispielsweise Carotinoide, Steroide, Prenylchinonseitenketten oder Phytolreste in Chlorophyllen (Coolbear & Threlfall, (1989) in Biosynthesis of terpenoid lipids, ed. Ratledge & Wilkinson, (Academic Press), pp. 115-254, Bach, T.J. (1995) Lipids 30, 191-202).

15

Es wird postuliert, daß die Biosynthese des Isopentenylidiphosphats (IPP), dem C-5-Grundkörper aller Isoprenoide, über den Acetat-Mevalonat-Weg erfolgt (Banthorpe et al., (1972) Chem. Rev. 72, 115-155; Beyia & Porter, (1976) Annu. Rev. Biochem. 45, 113-142).

20

Vor kurzem wurde durch ^{13}C -Markierungsversuche an Bakterien, Algen and Pflanzen die Existenz eines zum Acetat-Mevalonat-Weg alternativen Stoffwechselweges zum IPP nachgewiesen (Rohmer et al., (1993) Biochem. J 295, 517-524; Rohmer et al., (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 2564-2566).

25

Als erstes Zwischenprodukt dieses alternativen Isoprenoidbiosyntheseweges wurde 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) postuliert, das in einer Thiamindiphosphat-abhängigen Reaktion aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) synthetisiert wird.

30

Die DXS katalysiert den ersten Reaktionsschritt des alternativen, nicht Mevalonat-abhängigen Isoprenoidbiosyntheseweges, d.h. die Synthese von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P).

DXP bzw. 1-Desoxy-D-xylulose (DOX) sind außerdem an der Biosynthese von Thiamin (Vitamin B₁) und Pyridoxol (Vitamin B₆) beteiligt (Hill et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 30426-30435; Himmeldirk et al., (1996) Chem. Commun., 1187-1188).

- 5 Darüber hinaus wurde über die Klonierung und Charakterisierung des *dxs*-Gens aus *E. coli* sowie die Überexpression des *dxs*-Genprodukts in *E. coli* berichtet (Lois et al., (1997) Abstracts 3rd Terpnnet Meeting on Plant Isoprenoids, p. 16, Universite de Poitiers, Frankreich). Die Bildung von DXP wurde mittels zellreien Extrakten nachgewiesen.
- 10 Für das Enzym DXS aus *E. coli* wurde eine Thiamindiphosphat-Bindungsstelle postuliert, wie sie z. B. aus anderen Enzymen, wie Pyruvat-Decarboxylasen, Acetolactat-Synthasen oder Transketolasen bekannt ist.
- 15 Ein Sequenzvergleich mit Sequenzinformationen auf Aminosäure-Ebene zeigte Homologien zu Genprodukten bisher unbekannter Funktion, so daß den folgenden offenen Leserahmen (ORF) die Funktion einer DXS zugeordnet werden kann: *E. coli* (EMBL Acc. No. U 82664, Bp 17765 bis 19627), *Haemophilus influenzae* (SwissProt Acc. No. P 45205), *Bacillus subtilis* (SwissProt Acc. No. P 54523);
- 20 *Rhodobacter capsulatus* (SwissProt Acc. No. P 26242), *Synechocystis* sp PCC6803 (GenBank Acc. No. D 90903), *Mycobacterium leprae* (Acc. No. P 46708), *Mycobacterium tuberculosis* (Acc. No. Z 96072), *Helicobacter pylori* (Acc. No. AE 000552), *Methanococcus jannaschii* (Acc. No. G 64384) und dem CLA 1 (oder Def) Gen aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc. No. U 27099; Mandel et al. (1996)
- 25 The Plant Journal 9, 649-658).

Weitere Recherchen in Sequenzdatenbanken ergaben für die DXS-Proteine Homologien zu Transketolase-ähnlichen Enzymen (z.B. EC 2.2.1.1) und den E1-Proteinen aus dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDH, EC 1.2.4.1) aus

30 verschiedenen Organismen. Die DXS-Proteine sind jedoch in der Regel kleiner als bakterielle Transketolasen.

Die Nukleinsäure-Sequenzen bzw. Nukleinsäuremoleküle kodierend für ein Protein mit der Funktion einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase werden als "dxs" und die Aminosäuresequenzen bzw. Proteine mit der Funktion einer 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase als "DXS" bezeichnet.

5

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß Enzyme mit der Funktion einer DXS einen neuen, hochspezifischen Angriffspunkt für die Entwicklung pestizider, insbesondere herbizider oder antibiotisch wirksamer Verbindungen darstellen.

10

Erfindungsgegenstand ist daher ein isoliertes Protein mit der Funktion einer DXS, oder ein aktives Fragment daraus, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DXS aus *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Methanococcus jannaschii* und *Arabidopsis thaliana*.

15

20

Das Protein mit der Funktion einer DXS oder ein aktives Fragment daraus läßt sich in einer rekombinanten Wirtszelle herstellen, indem man ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus in eine für eine Wirtszelle geeignete Expressionskassette inseriert; die so erhaltene Expressionskassette in geeigneter Weise in einen für eine Wirtszelle geeigneten Vektor inseriert; eine geeignete Wirtszelle mit dem so erhaltenen Vektor transformiert; die so transformierte Wirtszelle in einem geeigneten Medium kultiviert; und das von besagter Wirtszelle produzierte Protein mit der Funktion einer DXS oder das aktive Fragment daraus in geeigneter Weise aus dem Kulturmedium und/oder der Wirtszelle isoliert.

25

30

Insofern kann die Herstellung gereinigter DXS auf gentechnischem Wege erfolgen. Z. B. können zur Herstellung von rekombinanter DXS in einem Wirtsorganismus DXS-codierende DNA-Sequenzen in eine Expressionskassette kloniert werden, welche zur heterologen Expression des Strukturgens in dem ausgewählten Wirtsorganismus geeignet sind.

20.01.99

4

Hierfür sind beispielsweise folgende DXS-kodierenden DNA-Sequenzen geeignet: mikrobielle oder pflanzliche *dxs*-cDNA, mit gängigen Methoden in ihrer Sequenz veränderte pflanzliche *dxs*-cDNA-Moleküle, aber auch synthetische DNA-Sequenzen, abgeleitet aus mikrobieller oder pflanzlicher *dxs*-cDNA, die die Expression einer aktiven DXS oder deren aktiver Fragmente ermöglichen, insbesondere die oben genannten DXS-codierenden Sequenzen aus *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Synechocystis* sp. PCC6803, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Methanococcus jannaschii* und *Arabidopsis thaliana*.

DXS-kodierende DNA-Sequenzen sind auch verwendbar als Selektionsmarker, wie z. B. als Herbizidresistenzmarker.

Die Einführung spezifischer regulatorischer Sequenzen in die Expressionskassette kann außerdem erwünscht sein, beispielsweise von Promotoren, Operatorsequenzen, Enhancern, Terminatoren, Signalsequenzen, 5'- und 3'-untranslatierter Sequenzen, oder Sequenzen kodierend für geeignete Fusionsproteine. Die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzen ist allgemein übliche Technik, die je nach Expressionsstrategie breit variieren kann.

Die resultierende *dxs*-Expressionskassette, versehen mit den notwendigen regulatorischen Elementen im passenden Leserahmen des *dxs*-Strukturgens, kann in einen Expressionsvektor, mit welchem der ausgewählte Wirtsorganismus transformiert werden kann, inseriert werden. Geeignete Expressionsstrategien zur Herstellung rekombinanter Proteine und entsprechende Expressionsvektoren sind allgemein bekannt für Wirtsorganismen wie beispielsweise *E. coli*, Hefen und Insektenzellen. Der durch stabile oder transiente Transformation mit der *dxs*-Expressionskassette erhaltene rekombinante Organismus kann zur Gewinnung von rekombinanter DXS in gereinigter oder partiell gereinigter Form oder von Zellfraktionen, enthaltend DXS dienen. Der rekombinante Organismus kann gegebenenfalls auch direkter Bestandteil, d.h. zellulärer Bestandteil eines analytischen Testsystems sein.

Unter dem Begriff "rekombinanter Organismus" ist insofern die Zelle eines durch in vitro veränderter oder integrierter DNA modifizierten Organismus zu verstehen, beispielsweise von rekombinanten Hefe-, Bakterien-, Algen, Insekten- oder Pflanzenzellen.

5

Ein bevorzugtes Expressionssystem ist z. B. die Verwendung von E. coli als Wirtsorganismus. Als Vektoren können alle Vektoren dienen, die über die geeigneten Expressionssignale, wie z. B. Promotoren und geeignete Selektionsmarker, wie z. B. Resistenzgene oder Gene, die eine Auxotrophie komplementieren, verfügen.

10

Gentechnisch hergestellte DXS kann mittels verschiedener Methoden gereinigt werden. Die Eignung einer Methode hängt jeweils vom verwendeten Wirtsorganismus, der Expressionsstrategie und anderen Faktoren ab, die einem in der Expression und Reinigung rekombinanter Proteine erfahrenen Fachmann bekannt sind. Zum Zweck der Reinigung kann das rekombinante Protein auch durch entsprechende Veränderung seiner Gen-Sequenz in der Expressionskassette mit Peptidsequenzen fusioniert werden. Bevorzugt sind als Fusionspartner Peptide oder Proteine zu verwenden, die als C- oder N-terminale Fusionen der rekombinanten DXS eine Affinität zu bestimmten Säulenmaterialien verleihen. Solche Fusionen dürfen die Funktion der DXS nicht beeinflussen oder müssen z. B. durch Einbau geeigneter Proteaseschnittstellen unter Rekonstitution der Funktion abspaltbar sein. Als Beispiele für Fusionspartner seien Oligohistidin-Tails, das Strep-Tag™ (Biometra GmbH, Göttingen, BRD), die Glutathion-S-Transferase (GST) oder das Maltose-bindende Protein (MalE) genannt, ohne daß diese Anwendung auf die beispielhaft angegebenen Fusionspartner oder deren Fragmente beschränkt ist.

15

20

25

Die rekombinante oder gentechnische Herstellung und Reinigung der DXS ermöglicht z. B. die Verwendung von DXS in biochemischen Testsystemen zur Bestimmung der Enzymfunktion der DXS in Gegenwart von auszuprüfenden Testsubstanzen, insbesondere durch automatisiertes Prüfen (z.B. High Throughput Screening) von Testsubstanzen.

30

2001-98

6

Die erfindungsgemäßen Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika von DXS-Proteinen auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, chromatographisches Verhalten, Konformation, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc. gehören, sowie auch physikalische Eigenschaften wie z. B. das elektrophoretische Laufverhalten, Ladung, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften etc..

Ein wichtiges Charakteristikum einer DXS ist z. B. ihre Fähigkeit zur Synthese von DXP unter Umsetzung von Pyruvat und GA3P. Diese Aktivität kann z. B. wie in Beispiel Nr. 4 beschrieben bestimmt werden.

Mittels der erfindungsgemäßen Proteine lassen sich daher auch Effektoren der DXS identifizieren, indem man die enzymatische Aktivität der DXS, die zu einem direkt oder indirekt, qualitativ oder quantitativ meßbaren Signal führt, bestimmt, vorzugsweise indem man eine DXS mit geeigneten Substraten inkubiert und die enzymatische Aktivität der DXS in An- und Abwesenheit einer zu untersuchenden Testsubstanz bestimmt und vergleicht.

Die Identifizierung von Effektoren der DXS kann vorzugsweise in einem automatisierten Testsystem, z.B. durch sog. "High-Throughput-Screening", z.B. unter Verwendung von Pipettierrobotern und/oder computergestützten Steuer- und Analysesystemen erfolgen.

Man ist somit in der Lage, spezifische Inhibitoren oder Aktivatoren, d.h. Effektoren der DXS aufzufinden, so daß u.a. Stoffe identifiziert werden können, welche eine potentielle herbizide bzw. wachstumshemmende oder auch wachstumsfördernde Wirkung besitzen. Die zu untersuchende chemische Verbindung wird dabei bevorzugt in Konzentrationen zwischen 10^{-9} M und 10^{-3} M, und besonders bevorzugt in Konzentrationen zwischen 10^{-7} M und 10^{-4} M eingesetzt.

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DXS stehen eine Reihe von geeigneten Verfahren zur Verfügung, bei denen man die DXS in einem geeigneten

Reaktionspuffer unter geeigneten Reaktionsbedingungen bezüglich Reaktionstemperatur und dem pH-Wert der Reaktion in Anwesenheit von Thiamindiphosphat mit geeigneten Substraten, wie z. B. Pyruvat und GA3P, inkubiert.

5

Als bevorzugte Reaktionsbedingungen der DXS seien geeignete Reaktionspuffer mit einem pH-Wert zwischen pH 3 und pH 11, sowie Reaktionstemperaturen zwischen 2 °C und 60 °C genannt.

10

Die Quantifizierung der Enzyminhibition oder Enzymaktivierung (d.h. der effektorischen Wirkung) kann durch einen einfachen Vergleich der katalytischen Aktivität der DXS in Abwesenheit und in Anwesenheit der zu untersuchenden Testsubstanz unter ansonsten identischen Testbedingungen geschehen. Zur Bestimmung der Aktivität der DXS können verschiedene biochemische Meß-

15

Methoden eingesetzt werden, durch die entweder die Entstehung der Reaktionsprodukte der von der DXS katalysierten Reaktion, z. B. DXP, oder aber eine Abnahme der Konzentration der Enzymsubstrate der DXS, z. B. Pyruvat oder GA3P, gemessen werden, z.B. durch eine Endpunktbestimmung des DXP nach enzymatischer Umsetzung der Substrate Pyruvat und GA3P, die gegebenenfalls

20

radioaktiv markiert oder mit anderen gängigen Markern versehen waren oder durch nachgeschaltete Reaktionen nachgewiesen werden können, z.B. durch gekoppelte enzymatische Reaktionen.

25

Dem in der Durchführung von Enzymtests erfahrenen Fachmann stehen viele Standardmethoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten zur Verfügung (s. z. B. Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, Band 1 und 2, Verlag Chemie, Weinheim (1974), Suelter, C.H., Experimentelle Enzymologie: Grundlagen für die Laborpraxis, Fischer Stuttgart (1990)).

30

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DXS kann z. B. erfolgen, indem man die DXS mit [2-¹⁴C]-Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des gebildeten [2-¹⁴C]-1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat nach Abtrennung von noch nicht umgesetzten [2-¹⁴C]-Pyruvat und

GA3P qualitativ oder quantitativ bestimmt. Die Trennung des 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat von Pyruvat und GA3P kann z. B. an einer geeigneten stationären Phase unter Verwendung eines geeigneten Laufmittelgemischs z. B. durch Dünnschichtchromatographie oder durch HPLC erfolgen. Zur Verbesserung der Trennung von DXP, Pyruvat und GA3P können die im Reaktionsansatz enthaltenen Phosphorsäureester vor der chromatographischen Trennung z. B. durch Behandlung mit saurer oder alkalischer Phosphatase in die korrespondierenden Alkohole überführt werden. Bei der Aktivitätsbestimmung einer DXS können aber auch andere, radioaktiv markierte Substrate, wie z.B. [U- ^{14}C]-Pyruvat, ^{14}C -markiertes GA3P, ^3H -markiertes Pyruvat oder ^3H -markiertes GA3P an Stelle von [2- ^{14}C]-Pyruvat und GA3P verwendet werden.

Es ist weiterhin vorstellbar, radioaktiv markierte DXP-Derivate (z. B. ^{13}C -, ^{14}C - oder ^{32}P markiert u. a.), ausgehend von aufgereinigter DXS, herzustellen, um diese in Testsystemen einzusetzen. Radioaktiv markiertes DXP kann als spezifischer Metabolit zur Untersuchung von Folgeenzymen des 1-Desoxyxylulose-P-Weges eingesetzt werden und damit auch wiederum die Untersuchung von Effektoren ermöglichen. So könnte z. B. Die Bildung von ^{14}C -IPP oder anderen ^{14}C -Verbindungen nachgewiesen werden; jeglicher Effektor, der demnach die Umwandlung von ^{14}C -DXP in IPP *in vivo* oder *in vitro* absenkt, kann wiederum als mögliches Herbizid/Antibiotikum des gesamten Weges angesehen werden.

Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit [1- ^{14}C]-Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des bei der Reaktion freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt.

Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des bei der Reaktion noch nicht umgesetzten Pyruvats mit Hilfe des Enzyms Lactat Dehydrogenase zu Lactat umsetzt und die Abnahme der Konzentration des bei der Reaktion der Lactat Dehydrogenase als Cosubstrat benötigten reduzierten Nikotinamid-Dinukleotid (NADH) mit einem geeigneten Verfahren, z. B. photometrisch, bestimmt.

20.01.98

9

Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit die Menge des bei der Reaktion noch nicht umgesetzten GA3P mit Hilfe des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase zu 1,3-Bisphosphoglycerat umsetzt und die Zunahme der Konzentration der reduzierten Form des bei der Reaktion der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase als Cosubstrat benötigten Nikotinamid-Dinukleotids mit einem geeigneten Verfahren direkt, z. B. photometrisch, oder nach Kopplung mit der Reduktion von Tetrazoliumverbindungen, bestimmt.

Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und entweder nach Ablauf einer geeigneten Inkubationszeit oder in einem gekoppelten enzymatischen Testsystem kontinuierlich die Menge das bei der Reaktion freiwerdende CO_2 mit Hilfe des Enzyms Phosphoenolpyruvat Carboxylase zu Oxalacetat umsetzt und die Menge des so gebildeten Oxalacetats mit Hilfe des Enzyms Malat Dehydrogenase zu Malat umsetzt und die Abnahme der Konzentration des bei der Reaktion der Malat Dehydrogenase als Cosubstrat benötigten reduzierten Nikotinamid-Dinukleotid (NADH) mit einem geeigneten Verfahren, z. B. photometrisch, bestimmt.

Die Aktivität der DXS kann auch bestimmt werden, indem man z. B. die DXS mit Pyruvat und GA3P inkubiert und die Teilreaktion der Dekarboxylierung von Pyruvat an die Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol koppelt.

Die Bestimmung der effektorischen Wirkung von Testsubstanzen kann mit gereinigter DXS durchgeführt werden, aber auch mit ganzen Zellen eines rekombinanten Organismus, welcher die DXS rekombinant exprimiert, mit DXS-haltigen Extrakten aus diesem Organismus oder angereicherten DXS-haltigen Fraktionen aus diesem Organismus. Als bevorzugter rekombinanter Wirtsorganismus seien Bakterien-, Insekten- und Hefezellen genannt. Alternativ kann auch eine aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellkulturen isolierte DXS verwendet werden. Es ist bekannt, daß DXP zu DMAPP/IPP über eine Reihe von Zwischenschritten umgesetzt wird. Die Einzelheiten, also die entstehenden

20.01.99

10

Folgeenzyme sind noch nicht analysiert worden. Es ist jedoch bekannt, daß die Umsetzung über Kinasen, Oxidoreduktasen, Isomerasen und Mutasen erfolgt. Insofern ist zu erwarten, daß die Folgeenzyme ebenfalls Wirkorte für Herbizide und Antibiotika darstellen und ebenfalls als Effektoren fungieren.

5

Für verschiedene Anwendungen wie z. B. die Herstellung eines o.g. biochemischen Testsystems zur Bestimmung einer Proteinfunktion ist eine wesentliche Voraussetzung, daß das zu untersuchende Protein in funktionsfähigem Zustand und möglichst rein, d. h. frei von störenden Aktivitäten, gewonnen werden kann. Wie bei allen Zellproteinen kann dies im Falle der DXS dadurch geschehen, daß das Enzym mit Hilfe gängiger Verfahren der Proteinreinigung aus den Organismen oder Geweben isoliert wird. In der vorliegenden Erfindung ist dargelegt, daß eine funktionell intakte DXS isoliert werden kann, deren Sequenz beispielhaft für E. coli mit SEQ ID Nr. 1 angegeben ist und mit der Sequenz aus der EMBL Datenbank Acc. No. U 82664 übereinstimmt.

10

15

1 MSFDIAKYPT LALVDSTQEL RLLPKESLPK LCDELRRYLL DSVSRSSGHF
51 ASGLGTVELT VALHYVYNTF FDQLIWDVGH QAYPHKILTG RRDKIGTIRQ
101 KGGLHPFPWR GESEYDVLSV GHSSTISISAG IGIAVAAEKE GKNRRTVCVI
20 151 GDGAITAGMA FEAMNHAGDI RPDMLVILND NEMSISENVG ALNNHLAQLL
201 SGKLYSSLRE GGKKVFSGVP PIKELLKRTE EHIKGMVVPG TLFEELGFNY
251 IGPVDGHDVL GLITTLKNMR DLKGPQFLHI MTKKGRGYEP AEKDPITFHA
301 VPKFDPSSGC LPKSSGGLPS YSKIFGDWLC ETAAKDNKLM AITPAMREGS
351 GMVEFSRKFP DRYFDVAIAE QHAVTFAAGL AIGGYKPIVA IYSTFLQRAY
25 401 DQVLHDVAIQ KLPVLFAIDR AGIVGADGQT HQGAFDLSYL RCIPEMVIMT
451 PSDENECRQM LYTGYYHNDG PSAVRYPRGN AVGVELTPLE KLPIGKGIVK
501 RRGEKLAILN FGTLMPAAK VAESLNATLV DMRFVKPLDE ALILEMAASH
551 EALVTVEENA IMGGAGSGVN EVLMAHRKPV PVLNIGLPDF FIPQGTQEEM
601 RAEGLDAAG MEAKIKAWLA

30

Die Verwendungsmöglichkeiten der DXS basieren im wesentlichen auf ihrer enzymatischen Aktivität. Die Bereitstellung funktionell intakter DXS ermöglicht sowohl in vitro (z. B. zellfreies Testsystem der DXS) als auch in vivo die

Durchführung von biochemischen Reaktionen, beispielsweise in ein- oder mehrzelligen rekombinanten Organismen oder Zellkulturen, insbesondere Hefen, Bakterien, Algen, Insektenzellen oder Pflanzen.

- 5 Diese Reaktionen können einerseits zur Herstellung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) oder Folgeprodukten wie z. B. Thiamin, Pyridoxin und Isoprenoide (u. a. Carotinoide, Chlorophylle, Phytole, Lutein, Sterole, Ubichinone/Menachinone/Plastochinone, Dolichol, Naturkautschuk, Paclitaxel /Docetaxel (Handelsnamen Taxol/Taxotere) genutzt werden, andererseits können
- 10 diese biochemischen Reaktionen dazu verwendet werden, um in einem Testsystem die Wirkung von chemischen Verbindungen oder heterogenen Stoffgemischen in bezug auf die Funktion der DXS zu bestimmen.

- 15 Des weiteren kann die gentechnisch hergestellte DXS beispielsweise auch verwendet werden, um die Raumstruktur des Enzyms aufzuklären. Zur Aufklärung der Raumstruktur können allgemein bekannte Verfahren, wie z. B. die Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen oder NMR-Spektroskopie verwendet werden. Die Strukturinformationen über die DXS, können beispielsweise verwendet werden, um ein rationales Design von neuen Inhibitoren der DXS - und somit
- 20 potentiellen Herbiziden - durchzuführen.

- Erfindungsgegenstand sind auch Effektoren der DXS, identifizierbar durch enzymatische Aktivitätsbestimmungen der DXS, Effektoren der DXS, die ein Strukturanalages des Pyruvat, des GA3P oder des DXP sind, insbesondere
- 25 antibiotisch, pestizid oder herbizid wirksame Effektoren der DXS.

In den nachfolgenden Beispielen, die der näheren Erläuterung der Erfindung dienen und die in keiner Weise eine Einschränkung bedeuten sollen, wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

Bakterienstämme und Plasmide:

Escherichia coli K 12, W3110 Wildtyp-Stamm (erhältlich von Genetic Stock Center der Yale Universität, U.S.A.) wurde als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von chromosomaler DNA verwendet.

5

Zur Klonierung und Expression von *dxs* in *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-I* *relA1*) (Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580) und *E. coli* JM 109 (*recA11* *supE44* *endA11* *hsdR17* *gyrA96* *relA1* *thi* Δ (*lac-proAB*) F' [*traD36* *proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15]) (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119) wurde der Plasmid pUCBM20 (Boehringer Mannheim, BRD) eingesetzt.

10

Klonierungstechniken:

Zur Klonierung (Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, NY), PCR-Amplifizierung (Mullis und Faloona, (1987) Meth. Enzymol. 155, 335-350) und Transformation von DNA (Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580) wurden im allgemeinen die in den Literaturstellen beschriebenen Standardtechniken verwendet.

15

Es ist zu erwarten, daß eine veränderte DXS-Aktivität, insbesondere eine Aktivitätserhöhung, zu einer verstärkten Bildung von DXP-Derivaten (z. B. Thiamin oder Pyridoxin) und isoprenoiden Substanzen führt. Hierzu zählen Carotinoide. DXS ist sowohl von Interesse als Wirkort zur Hemmung der IPP-Synthese (Herbizide, Antibiotika). Erfindungsgegenstand ist aber auch eine Erhöhung der DXS-Aktivität und die verstärkte Bildung von DXP-Derivaten wie Thiamin oder Pyridoxin (Vitamine B1 und B6), und vor allem von isoprenoiden Substanzen. Dazu sollen, in möglichst breitem Maße, namentlich aber nicht ausschließlich, beansprucht werden: Carotinoide, Chlorophylle, Phytole, Lutein, Sterole, Ubichionine/Menachinone/Plastochinone, Dolichol, Naturkautschuk, Paclitaxel/Docetaxel (Handelsnamen Taxol/Taxotère), u. a. kommerziell interessante Verbindungen.

20

25

30

Beispiel 1: Isolierung und Klonierung des dxs-Gens aus E. coli

Das dxs-Gen wurde aus E. coli K12 Wildtyp-Stamm W 3110 mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung der bekannten E.coli Genomsequenz U 82664 und dem folgenden Primer amplifiziert:

DXSEC05: 5' CCGAATTCACRGCCCCTGATGAGTTTTGAT 3' (Bp 19636-19616)
und

DXSEC03: 5' TTGCATGCAGGAGTGGAGTAGGGATTATG 3' (Bp 17747-17769).

Die PCR-Primern DXSEC05 und DXSEC03 enthalten Restriktionsschnittstellen für die Enzyme EcoRI bzw. SphI.

Zur Durchführung der PCR wurden jeweils 100 pmol der Primer mit 1,6 ng chromosomaler DNA aus E. coli K-12 Wildtyp Stamm LJ 110 (W3110) eingesetzt. Nach Denaturieren des DNA-Doppelstranges bei 95°C für 30 Sekunden, folgten 30 Zyklen von jeweils: annealing bei 60°C, Polymerisation bei 72°C und nachfolgender Denaturierung bei 95°C (1 min).

Die Sequenz des PCR-Produkts (SEQ ID Nr. 2) wurde mittels eines A.L.F. Systems (Pharmacia, Freiburg, BRD) bestimmt:

```

1  ATGAGTTTTG ATATTGCCAA ATACCCGACC CTGGCACTGG TCGACTCCAC
51  CCAGGAGTTA CGACTGTTGC CGAAAGAGAG TTTACCGAAA CTCTGCGACG
25  101  AACTGCGCCG CTATTTACTC GACAGCGTGA GCCGTTCCAG CGGGCACTTC
151  GCCTCCGGGC TGGGCACGGT CGAACTGACC GTGGCGCTGC ACTATGTCTA
201  CAACACCCCG TTTGACCAAT TGATTTGGGA TGTGGGGCAT CAGGCTTATC
251  CGCATAAAAT TTTGACCGGA CGCCGCGACA AAATCGGCAC CATCCGTCAG
301  AAAGGCGGTC TGCACCCGTT CCCGTGGCGC GGCGAAAGCG AATATGACGT
30  351  ATTAAGCGTC GGGCATT CAT CAACCTCCAT CAGTGCCGGA ATTGGTATTG
401  CGGTTGCTGC CGAAAAAGAA GGCAAAATC GCCGCACCGT CTGTGTCATT
451  GGCGATGGCG CGATTACCGC AGGCATGGCG TTTGAAGCGA TGAATCACGC
501  GGGCGATATC CGTCCTGATA TGCTGGTGAT TCTCAACGAC AATGAAATGT
551  CGATTTCCGA AAATGTCGGC GCGCTCAACA ACCATCTGGC ACAGCTGCTT
35  601  TCCGGTAAGC TTTACTCTTC ACTGCGCGAA GGCGGGAAAA AAGTTTCTC
651  TGGCGTGCCG CCAATTAAAG AGCTGCTCAA ACGCACCGAA GAACATATTA

```

5
 10
 15
 20
 25

```

701  AAGGCATGGT AGTGCCTGGC ACGTTGTTTG AAGAGCTGGG CTTTAACTAC
751  ATCGGCCCGG TGGACGGTCA CGATGTGCTG GGGCTTATCA CCACGCTAAA
801  GAACATGCGC GACCTGAAAG GCCCGCAGTT CCTGCATATC ATGACCAAAA
851  AAGGTCGTGG TTATGAACCG GCAGAAAAAG ACCCGATCAC TTTCCACGCC
901  GTGCCTAAAT TTGATCCCTC CAGCGGTTGT TTGCCGAAAA GTAGCGGCGG
951  TTTGCCGAGC TATTCAAAAA TCTTTGGCGA CTGGTTGTGC GAAACGGCAG
1001 CGAAAGACAA CAAGCTGATG GCGATTACTC CGGCGATGCG TGAAGGTTCC
1051 GGCATGGTCG AGTTTTTCACG TAAATTCCCG GATCGCTACT TCGACGTGGC
1101 AATTGCCGAG CAACACGCGG TGACCTTTGC TGCGGGTCTG GCGATTGGTG
1151 GGTACAAACC CATTGTGCGG ATTTACTCCA CTTTCCTGCA ACGCGCCTAT
1201 GATCAGGTGC TGCATGACGT GGCGATTCAA AAGCTTCCGG TCCTGTTGCG
1251 CATCGACCGC GCGGGCATTG TTGGTGCTGA CCGTCAAACC CATCAGGGTG
1301 CTTTGTGATCT CTCTTACCTG CGCTGCATAC CGGAAATGGT CATTATGACC
1351 CCGAGCGATG AAAACGAATG TCGCCAGATG CTCTATACCG GCTATCACTA
1401 TAACGATGGC CCGTCAGCGG TGCGCTACCC GCGTGGCAAC GCGGTCGGCG
1451 TGGAAGTAC GCGGCTGGAA AACTACCAA TTGGCAAAGG CATTGTGAAG
1501 CGTCGTGGCG AGAAACTGGC GATCCTTAAC TTTGGTACGC TGATGCCAGA
1551 AGCGGCGAAA GTCGCCGAAT CGCTGAACGC CACGCTGGTC GATATGCGTT
1601 TTGTGAAACC GCTTGATGAA GCGTTAATTC TGGAATGGC CGCCAGCCAT
1651 GAAGCGCTGG TCACCGTAGA AGAAAACGCC ATTATGGGCG GCGCAGGCAG
1701 CGGCGTGAAC GAAGTGCTGA TGGCCCATCG TAAACCAGTA CCCGTGCTGA
1751 ACATTGGCCT GCCGGACTTC TTTATTCCGC AAGGAACTCA GGAAGAAATG
1801 CGCGCCGAAC TCGGCCTCGA TGCCGCTGGT ATGGAAGCCA AAATCAAGGC
1851 CTGGCTGGCA TAA
  
```

Beispiel 2: Expression des dxs-Gens in E. coli JM 109

Das resultierende 1,9 kb PCR-Fragment mit einer 7 bp strangaufwärts gelegenen Ribosomen-Bindungsstelle (AGG) wurde isoliert und über die EcoRI- und SphI-Schnittstellen in den Plasmid pUCBM20 (Boehringer Mannheim, BRD) subkloniert. Nach Transformation in E. coli JM109, wurde die Integrität der Plasmide durch Restriktionsanalyse überprüft. Die Expression erfolgte durch den auf dem Plasmid gelegenen lac-Promoter.

Beispiel 3: Reinigung des Enzyms DXS aus rekombinanten E. coli JM 109 Zellen

Methode A

5 E. coli JM109 Zellen, die das Plasmid pUCBM20 mit dem inserierten dxs-Gen
enthielten, wurden in LB-Medium (insgesamt 9,6 Liter) mit Ampicillin (100 mg/l) bis
zu einer optischen Dichte von 0,8 kultiviert und 4 h lang mit Isopropyl-beta-D-
thiogalaktosid (IPTG) (0,4 mM) induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation
geerntet, mit 50 mM Tris/HCl, 1 mM Dithiothreitol, 0,5 mM Thiamindiphosphat, 5 mM
10 MgCl_2 , pH 7,5 (Puffer A) gewaschen, in Puffer A resuspendiert (2,5 ml / g
Zellfeuchtgewicht), und durch 3 Passagen in einer French Press aufgeschlossen.
Nach Zentrifugation wurde die Zelldebris verworfen und dem Überstand (173 ml) zur
Fällung der Proteine 225 g/l NH_4SO_4 bei 0°C zugesetzt. Das Präzipitat wurde in
Puffer A resuspendiert und ultrafiltriert.

15 Die Probe (63 ml) wurde anschließend auf eine Q-Sepharose HP-Säule (Pharmacia
Biotech, Schweden) aufgetragen, mit Puffer A gewaschen, und mittels eines
ansteigenden Salzgradienten (0-1 M NaCl in Puffer A) im Bereich zwischen 0,2 und
0,3 M NaCl eluiert.

20

Methode B

25 E. coli JM 109 Zellen, die das Plasmid pUCBM20 mit dem inserierten dxs-Gen
enthielten, wurden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm
kultiviert und mindestens 4 h lang mit Isopropyl-beta-D-thiogalaktosid (IPTG) (0,4
mM) induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, mit 50 mM Tris/HCl,
1 mM Dithiothreitol, 0,5 mM Thiamindiphosphat, 5 mM MgCl_2 , pH 7,5 (Puffer A)
gewaschen, in Puffer A resuspendiert (2,5 ml/g Zellfeuchtgewicht) und unter Kühlen
30 in einem Ethanol/Eisbad in einem Branson Sonifier Ultraschallbad beschallt (10 30
sec Pulse bei 40 W Arbeitsleistung, 50 % Wirkleistung). Nach Zentrifugation (1 h
bei 38.00 x g) wurde der Überstand als zellfreier Extrakt verwendet.
Ammoniumsulfat (22,5 g/100 ml, 40 % Sättigung) wurde bei 4°C zugesetzt. Das

Präzipitat wurde in Puffer A resuspendiert, das Ammoniumsulfat durch wiederholte Ultrafiltration entfernt und die resultierende Lösung zentrifugiert (30 min, 3.800 x g).

Die Probe wurde dann auf eine Q-Sepharose HP-Anionenaustauschssäule (100 ml Innenvolumen, Pharmacia Biotech, Schweden) aufgetragen, mit Puffer A gewaschen und mittels eines ansteigenden Salzgradienten (0-1 M NaCl in Puffer A) eluiert. DXS Synthase wurde bei 0,1 bis 0,2 M NaCl eluiert. In einer zweiten Anionenaustauschchromatographie wurde eine DE AE-6509 Tentakelsäule (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit dem gleichen Puffer und Salzgradienten verwendet.

Die Rohextrakte und (partiell) gereinigtes Enzym wurden mittels des unten beschriebenen Testverfahrens auf ihre enzymatischen Eigenschaften hin untersucht, aus Pyruvat und GA3P DXS zu bilden. Bezogen auf die rekombinanten Zellen, konnte eine ca. 17-fache Anreicherung erzielt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1:

Probe	DXS-Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]
E. coli LJ 110	0,4
E. coli JM 109/pUCBM20dxs - IPTG	12,2
E. coli JM 109/pUCBM20dxs + IPTG	51,6
DXS (angereichert)	850

Im Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophoresegel (SDS-PAGE) besitzt das gereinigte DXS-Protein ein apparentes Molekulargewicht von ca. 66 kDa. Die Molmasse von 66 kD stimmt mit der aus der DNA-Sequenz erwarteten Molmasse von 67,6 kD überein.

Beispiel 4: Enzymtest der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

Der Test der enzymatischen Aktivität der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase wurde in Gegenwart von 200 mM Natriumcitrat-Puffer, pH 6,0, 10 mM Pyruvat,

30 mM D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat, 20 mM MgCl_2 , 1,5 mM Thiamindiphosphat (THDP), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,4 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 μCi $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Pyruvat und der zu untersuchenden Probe in einem Gesamtvolumen von 50 μl durchgeführt.

5

Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 4 Stunden (h) bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20%iger Perchlorsäure (5 μl) gestoppt. Der Überstand wurde mit 5 molarer K_2CO_3 (8 μl) neutralisiert.

10

Zu einem Aliquot von 5 μl des DXS-Reaktionsüberstandes wurden 15 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (1,5 μl , Boehringer Mannheim, Nr. 108138) hinzugefügt und 30 min lang bei 30°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt, DXP, wurde nach Dephosphorylierung durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase als 1-Desoxy-D-xylulose auf einer Aminex HPX-87H (300 x 7.8 cm) HPLC-Säule (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD) nachgewiesen, indem die Lösung anschließend auf eine Aminex HPX-87H HPLC-Säule aufgetragen und mit 6 mM H_2SO_4 bei einer Temperatur von 65°C nach Herstellerangaben eluiert wurde.

15

20

Der Nachweis des DXP und der 1-Desoxy-D-xylulose erfolgte durch einen in Reihe geschlossenen UV-Monitor (185 nm) und einen Radiomonitor (Berthold LB506C). 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat eluierte im Ausschlußvolumen der Säule. Die Konzentration und Signalpositionen wurden mittels chemisch synthetisierter Standards der jeweiligen 1-Desoxy-Xylulose-Derivate (von T. Begley, Cornell University, New York, U.S.A.) bestimmt.

25

1 Unit (U) der enzymatischen Aktivität der DXS wurde als die Bildung von 1 $\mu\text{mol/min}$ DXP bei einer Temperatur von 30° C definiert.

30

Durch Dialyse gegen einen Puffer ohne Thiamindiphosphat (THDP) verlor das Enzym seine Aktivität. Die Aktivität konnte jedoch zu mehr als 50% rekonstituiert werden, wenn THDP hinzugefügt wurde. Das Enzym zeigte insofern eine reversible, Thiamindiphosphat-abhängige Aktivität.

Beispiel 5: Identifizierung des Reaktionsprodukts DXP

Pyruvat und GA3P wurden in Gegenwart von gereinigter DXS unter den in Beispiel 4 genannten Reaktionsbedingungen umgesetzt. Ein hochauflösendes ^1H -NMR-Spektrum bei 400,13 MHz bzw. ein ^{31}P -NMR-Spektrum bei 161.97 MHz wurden an einem AMX-400 WB Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, BRD) aufgenommen und ergab für DXP: 5,47 (d, 1,9 Hz, 1H); 4,38 (td, 6,5 Hz, 1,9 Hz, 1H); 3,90 (dd, 6,5 Hz, 7,3 Hz, 2H); 2,34 (s, 3H).

Diese Ergebnisse stimmten mit den NMR-Daten von chemisch synthetisiertem 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP, von T. Begley, Cornell University, New York, U.S.A.) überein.

Beispiel 6: Inhibition der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

Die gemäß Beispiel 3 gereinigte DXS wurde auf ihre in vitro Aktivität wie in Beispiel 4 beschrieben getestet. Die gemessene relative Aktivität des Ansatzes in Abwesenheit von Testsubstanzen wurde in Gegenwart von 1, 2 und 10 mM Pyruvat mit 100% festgelegt. Nach Zusatz des Pyruvatanalogen (jeweils 10 mM) wurde die verbliebene Aktivität der DXS in Gegenwart des Kompetitors ermittelt (Tab. 2).

Tabelle 2: Inhibition der DXS durch Strukturanaloge des Pyruvat

		DXS-Aktivität [%]	
		mit Effektor (10 mM)	
		Nr. 1	Nr. 2
Pyruvat (mM)	ohne Inhibitor		
10	100	96	45
2	100	95	9
1	100	103	6

Schutzansprüche:

1. **Isoliertes Protein, gekennzeichnet durch die Funktion einer DXS oder ein aktives Fragment daraus.**
5
2. **Isoliertes Protein gemäß Anspruch 1, herstellbar, indem man**
 - a) **ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit der Funktion einer DXS oder eines aktiven Fragments daraus in eine für eine Wirtszelle geeignete Expressionskassette inseriert;**
 - 10 b) **die so erhaltene Expressionskassette in geeigneter Weise in einen für die Wirtszelle geeigneten Vektor inseriert;**
 - c) **eine geeignete Wirtszelle mit dem so erhaltenen Vektor transformiert;**
 - d) **die so transformierte Wirtszelle in einem geeigneten Medium kultiviert; und**
 - 15 e) **das von besagter Wirtszelle produzierte Protein mit der Funktion einer DXS oder das aktive Fragment daraus in geeigneter Weise aus dem Kulturmedium oder der Wirtszelle isoliert.**
3. **Isoliertes Protein gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch SEQ ID Nr. 1.**
20
4. **Effektor der DXS, identifizierbar, indem man**
 - a) **die enzymatische Aktivität der DXS in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt;**
 - b) **die enzymatische Aktivität der DXS in Anwesenheit besagter**
25 **Testsubstanz bestimmt; und**
 - c) **die unter a) und b) ermittelten enzymatischen Aktivitäten miteinander vergleicht.**
5. **Effektor der DXS, der ein Strukturanaloges des Pyruvats, des GA3P oder des DXP ist.**
30

20.01.98

20

AGR 97/M 225 UM

6. Pestizid wirksamer Effektor gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 und 5.
7. Antibakteriell wirksamer Effektor gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 und 5.
8. Herbizid wirksamer Effektor gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 und 5.

5